

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-503454

⑬ 公表 平成4年(1992)6月25日

⑭ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 12 Q 1/68

ZNA A

8114-4B

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

(全 15 頁)

⑮ 発明の名称 結核菌の検出及び分化のためのプローブ、キット及び方法

⑯ 特 願 平2-503934

⑰ 翻訳文提出日 平3(1991)8月21日

⑱ 出 願 平2(1990)2月22日

⑲ 国際出願 PCT/GB90/00276

⑳ 国際公開番号 WO90/10085

㉑ 国際公開日 平2(1990)9月7日

優先権主張 ㉒ 1989年2月22日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 8903968.9

㉕ 発明者 マックアダム, ラス アン

アメリカ合衆国, ニューヨーク 10461, ブロンクス, モーリス
パーク アベニュー 1300, アルバート アインシュタイン カレッジ
オブ メディシアン オブ イエシラ ユニバーシティ デパ
ートメント オブ マイクロバイオロジー アンド イミヌノロジ
ー

㉖ 出 願 人 コージェント リミテッド

イギリス国, ロンドン イーシー4エヌ 4ティービー, クイーン
ビクトリア ストリート 11, テンプル コート

㉗ 代理人 弁理士 青木 朗 外3名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), S
E(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. マイコバクテリウム フォルツイタムのプラスミドのDNAによりマイコバクテリウム ツベルキュロシスのゲノムライブラリーをスクリーンすることによって得られるマイコバクテリウム ツベルキュロシスのゲノムDNAとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

2. マイコバクテリウム ツベルキュロシスのゲノムDNA及びマイコバクテリウム フォルツイタムのプラスミドとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

3. 本明細書の第2図に示されるヌクレオチド配列、又はその相補的配列を含み、又はそれとハイブリダイズし、又は本明細書の第2図に示されるヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションによるマイコバクテリウム ツベルキュロシス複合体の生物のゲノムライブラリーから得られるヌクレオチド配列を含み、又はそれとハイブリダイズし、そしてマイコバクテリウム ツベルキュロシス複合体の細菌メンバーを、お互いから又はその複合体以外の細菌から区別し、そして特徴づけることができる、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

4. 前記ゲノムライブラリーがマイコバクテリウム ツベルキュロシス株50410から得られる請求の範囲第1項記載のヌクレオチドプローブ。

5. 図面の第2図又は第4図のいずれかに示されるヌクレオチド配列又はその相補的配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

6. マイコバクテリウム ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、2種の逆方向反復体配列により結合され、そして図面の第2図に同定されるヌクレオチドコード配列を含む挿入要素のヌクレオチド配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

7. マイコバクテリウム ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、2種の逆方向反復体配列により結合され、そして図面の第2図に固定されるヌクレオチドコード配列を含む挿入要素ヌクレオチド配列に隣接して存在するヌクレオチドのフランキング配列を含み、又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

8. 図面の第2図における塩基896の3'末端の下流に存在するヌクレオチドのフランキング配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズする請求の範囲第7項記載のヌクレオチドプローブ。

9. マイコバクテリウム ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、図面の第2図に示されるヌクレオチド配列の3'末端の下流に存在する約1.9 kbのヌクレオチド配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズする、

結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブ。

10. マイコバクテリウム ツベルキュロシス、マイコバクテリウム ボビス及びBCG間を区別することができる請求の範囲第1～9項のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブ。

11. マイコバクテリウム ツベルキュロシスの種々の株又は単離体間を区別することができる請求の範囲第1～10項のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブ。

12. マイコバクテリウム パラツベルキュロシス、マイコバクテリウム イントラセルラレ、マイコバクテリウム スクロフラセウム、マイコバクテリウム フレイ、マイコバクテリウム フォルツイタム、マイコバクテリウム カンサジイ、マイコバクテリウム アビウム、マイコバクテリウム マルニオエンセ、マイコバクテリウム フラベスセンス、マイコバクテリウム ゴルドナエ及びマイコバクテリウム ケロネイからの核酸に対して有意なハイブリダイゼーションを示さない請求の範囲第1～10のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブ。

13. 請求の範囲第1～10のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブを含んで成るキット。

14. 請求の範囲第1～10のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブを用いることを含んで成る、疫病学的研究のために臨床学的サンプルにおける結核菌を検出し、区別し、そして／又は特徴づけるための方法。

明 細 書

結核菌の検出及び分化のためのプローブ、キット及び方法

技術分野

本発明は、結核菌の検出及び分化のための遺伝子プローブ、キット及び方法に関する。特に、本発明は、結核症の診断のための及び／又はM. ツベルキュロシス (*M. tuberculosis*) 複合体のメンバーにより引き起こされる感染の進行を調べるための疫学研究手段のための遺伝子プローブ、キット及び方法に関する。

技術背景

連合王国に含まれるいくつかの進行国において、結核症は主な法定伝染病の1つであり、そしてさらに、M. ツベルキュロシスの病原性の機構はほとんど理解されていない。進行国又は第三次国において、この病気は莫大な割合の国土健康問題であり、そしてそれによって、抗生物質の組合せによる長期の処理を包含する。結核症における主な問題の1つは単純で信頼できる血清診断又は遺伝子プローブアッセイの欠除であることが十分に理解される。これらは、現在の診断試験、たとえば技術的に進歩した富国において入手できるものでさえ、不十分に特異的であり、そして鈍く、比較的未熟な症候学及び放射線写真術の組合せに基づかれ、そして抗酸性パチ

15. マイコバクテリウム ツベルキュロシス複合体の細菌メンバーをお互いから又は複合体以外の細菌から区別し、そして特徴づけるための方法であって：

特定の制限酵素により細菌のサンプルからのDNAを消化し；そして

請求の範囲第1～10のいずれか1項記載のヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーション分析を行なうことを含んで成る方法。

16. 実質的に図面に記載されるようなヌクレオチドプローブ。

17. 図面に実質的に記載されるような結核菌を検出し、区別し、そして特徴づけるための方法。

リス及び細菌培養物についての染色に基づかれています、必要である。初めの2つは、広く変わりやすい特徴を有し、そして2番目の2つは非常に信頼できない。特に、現在利用できる試験に関して、明確な結果を得るために数週間を要し、そしてひじょうに汚染されたサンプルにおける少数のM. ツベルキュロシス細菌の検出はしばしば困難である。結核菌の特異的同定もまた困難であり、そして特に、M. ツベルキュロシス複合体：M. ツベルキュロシス自体、ウシ菌株M. ボビス (*M. bovis*)、M. アフリカナム (*M. africanum*)、M. ミクロチ (*M. microti*) 及びワクチン株BCG (免疫学的に抑制された個人に病気を引き起こすことができる)のメンバー間の差別の同定は困難である。結核症のための新しい実験室試験を開発する試みがなされて来たが、しかしすべては、低い特異性及び／又は感度を有した。生物の特異的DNA配列のための遺伝子プローブは、長い培養段階又は染色された痰スミアの訓練されたスタッフによる困難な実験を必要としない方法により、少量の結核菌ゲノムを確実に検出することができる。遺伝子プローブ分析は、他の生物の存在における少数の特定の細菌の早い検出のための敏感な方法を提供する。

ヒトにおいて有意な健康問題が存在するように、結核菌により引き起こされる感染はまた、家畜、シカ、羊及びアナグマにおける有意な健康問題でもあり、そしてここで提供されるプローブはまた、これらの種に対して使用するための診断／疫学研究手段のためにも有用である。

M. ツベルキュロシス複合体の株を同定するための遺伝子

プローブは市販されているが、しかしリボソームRNAの検出に依存し、そしてまず細菌の培養を必要とする。これらの遺伝子プローブは、M. ツベルキュロシス複合体を同定することができるけれども、それらは痰の検体における細菌を検出するために適切でない。培養段階はまた、試験時間を長くし、そしてこれは欠点である。

M. ツベルキュロシス複合体に対して特異的な反復要素を含むM. ツベルキュロシス DNAのフラグメントの単離及びクローニングがここに記載されている。このフラグメントは、M. ツベルキュロシスの種々の単離物における複数の多型制限フラグメントにハイブリッドし、そして従って、結核症の伝達の研究のための単離物をフィンガープリントすることができる。単に少ないハイブリダイジングバンドがM. ボビス (M. bovis) 又はBCG DNAの消化物に検出され、そして従って、そのプローブは、M. ツベルキュロシス複合体のこれらの種々のメンバー間を急速に区別するユニークな能力を有する。

いくつかの反復要素が結核菌種から単離されており、たとえばM. レプラエ (M. leprae) (Clark-Curtiss, J. E. & Walsh, G. P. (1989) *Journal of Bacteriology* 171, 4844-4851; Clark-Curtiss, J. E. & Docherty, M. A. (1989) *Journal of Infectious Diseases* 159, 7-15; 及び Grosskinsky, C. M. Jacobs, W. R. Clark-Curtiss, J. E. & Bloom, B. R. (1989) *Infection and Immunity* 57, 1535-1541) から1種及びM. パラツベルキュロシスから挿入配列IS90

NAの使用により表わされた。驚くべき事には、これがM. ツベルキュロシスにおけるいづれかのプラスミドの存在を表わさない場合、それは、プラスミドDNAとハイブリダイズすることができるM. ツベルキュロシスの染色体DNAフラグメントが存在することを示した。さらに、制限エンドヌクレアーゼBamHI又はPvuIIにより消化された3種の臨床的単離物からの全体のDNAにおいて、ハイブリダイズするフラグメントの大きさは個々の株のために同じではなかった。

結核菌感染の検出のための遺伝子プローブは、細菌ゲノムにおける、それらが検出する遺伝子配列が与えられた科、属、種又は株に対していかにユニークであるかに依存して、種々の程度の特異性を有することができる。異なった特異性のプローブが、必要とされる臨床学的分析に依存して使用され得る。従って、1つのプローブは、与えられた属(たとえば結核菌)内の多くの異なった種(たとえばM. ツベルキュロシス及びM. ボビス)に見出される配列パターンを検出することができる。他の場合、遺伝子プローブは、特定の種に対して、及びその種の異なった株に対してさえ特異的であり得る。

遺伝子プローブのこの種々の特異性は、実質的に使用される。たとえば、診断の第1路として、一般的な結核菌感染を検出するプローブを使用し、そして次に、必要なら、結核菌の種が関与される診断に適切に同調されたプローブを使用することがより適切である。

O (Green, E. P. Tizard, M. L. V. Moss, M. T. Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J. & Hermon-Taylor, J. (1988) *Nucleic Acids Research* 17, 9063-9072) が単離された。しかしながら、これらの反復要素は、両者とも種特異性であり、そして種々の源からの菌株による一定のハイブリダイゼーションパターンを付与するように見える。

本発明は、反復要素の特徴化及び配列分析を記載し、それは挿入配列のIS3種のメンバーとしてその要素を同定し、ここでそれらのメンバーのうちいくつかのメンバーはこれまでに、腸内細菌の種から特徴づけられている。

結核菌の一般的な診断及び結核症の特定の診断に対して可能性ある適用を有するDNAプローブは、天然に存在するプラスミドに存在するこれらの配列とハイブリダイズすることができるデオキシリボスクレオチド配列に由来することができると見出された。

耐抗生物質の研究の一部として、M. ツベルキュロシスにおけるプラスミドの存在が、M. フォルツイタム (M. fortuitum) に存在することが知られている天然に存在するプラスミドからのDNAと3種の臨床的単離物からの完全なDNAとをハイブリダイズすることによって調べられた(A. Labidi, C. Dauguet, K. S. Goh & B. L. David, 1984, *Plasmid profiles of Mycobacterium fortuitum complex isolates*, *Current Microbiology* 11: 235-240)。プラスミドはM. ツベルキュロシスにこれまで見出されておらず、そして所望には、それらはプローブとしてのM. フォルツイタムプラスミドD

発明の開示

本発明は、M. フォルツイタムのプラスミドのDNAによりM. ツベルキュロシスのゲノムライブラリーをスクリーンすることによって得られるM. ツベルキュロシスのゲノムDNAとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

本発明はまた、M. ツベルキュロシスのゲノムDNA及びM. フォルツイタムのプラスミドのDNAとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

本発明はまた、本明細書の第2図に示されるヌクレオチド配列又はその相補的配列を含み、又はそれをハイブリダイズし、又はM. ツベルキュロシス複合体の生物のゲノムライブラリーから得られるヌクレオチド配列を含み又は本明細書の第2図に示されるヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションによりハイブリダイズし、そしてお互いから又は複合体でない他の細菌からM. ツベルキュロシス複合体の細菌メンバーを区別し、そして特徴づけることができる、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

また、ゲノムライブラリーがM. ツベルキュロシス株50410から得られる、結核菌感染の診断及び/又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブが提供される。

本発明はまた、第2図又は第4図のいづれかに示されるヌクレオチド配列又はその相補的配列の一部又はすべてを含み、

又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

ヌクレオチドプローブは、M. ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、2種の逆方向反復配列により結合され、そして第2図に同定されるヌクレオチドコード配列を含む挿入要素のヌクレオチド配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズすることができる。

本発明はまた、M. ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、2種の逆方向反復配列により結合され、そして第2図に同定されるヌクレオチドコード配列を含む挿入要素のヌクレオチド配列に隣接して存在するヌクレオチドのフランキンク配列を含み又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

たとえば、ヌクレオチドプローブは、第2図の塩基896の3'末端の下流で存在するヌクレオチドのフランキンク配列の一部又はすべてを含み又はそれとハイブリダイズすることができる。

本発明はまた、M. ツベルキュロシス株50410のゲノムにおいて、第2図に示される配列の3'末端のすぐ下流で存在する約1.9 kbのヌクレオチド配列の一部又はすべてを含み、又はそれとハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

本発明はまた、M. ツベルキュロシス株50410のゲノ

本発明はまた、上記ヌクレオチドプローブを用いることを含んで成る疫病学的研究のために臨床サンプル中の結核菌を検出し、区別し、そして／又は特徴づけるための方法を提供する。

本発明はまた、前記ヌクレオチドプローブの生成方法を提供する。

本発明はまた、M. ツベルキュロシス複合体の細菌メンバをお互いから及びその複合体以外の他の細菌から区別し、そして特徴づけるための方法を提供し、ここで前記方法は、i) 特定の制限酵素により細菌のサンプルからDNAを消化し；そしてii) 上記ヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーション分析を実施することを含んで成る。

遺伝子プローブを含んで成るヌクレオチド配列は、制限酵素のための制限部位を必ずしも含まない。

図面の簡単な説明

本発明をより明確に理解するために、実施態様が例により及び添付図面により、より詳しく説明されるであろう。

第1図は、プローブ5の制限地図を示し；

第2図は、プローブ5からのフラグメント5CのDNA配列及び大きな読み取り枠の翻訳生成物を示し；

第3図は、E. コリの挿入配列IS3及びIS3411と比較しての5Cの一部の一次DNA構造の比較を示し；

第4図は、プローブ5のフラグメント5Bの一部及びフラグメント5Cの一部をオーバーラップするDNA配列、すなわ

ムに存在し、そして第1図に示されるような制限地図により特徴づけられるヌクレオチド配列の一部又はすべてを含み又はそれと強くハイブリダイズする、結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のためのヌクレオチドプローブを提供する。

本発明のヌクレオチドプローブは、結核菌感染の診断及び／又は疫病学的研究のために使用され得る。本発明のヌクレオチドプローブは、M. ツベルキュロシスの種々の株間を区別することができる。本発明のヌクレオチドプローブは、M. ツベルキュロシス、M. ボビス及びBCG間を区別することができる。そのヌクレオチドプローブは、M. パラツベルキュロシス、M. イントラセルラレ (M. intracellulare)、M. スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、M. フレイ (M. phlei)、M. フォルツイタム (M. fortuitum)、M. ケロネイ (M. chelonae)、M. カンサシイ (M. kansasii)、M. アビウム (M. avium)、M. マルニオエンセ (M. malnisonse)、M. フラベセンス (M. flavescens)、及びM. ゴルドナエ (M. gordonae)との有意なハイブリダイゼーションを示すことができない。

本発明のヌクレオチドプローブは、ドットプロット分析、溶液ハイブリダイゼーション、サザンプロット分析又はポリマラーゼ連鎖反応の技法により臨床サンプル中の結核菌の検出のために使用され得る。その臨床サンプルは、痰、尿、脊髄液、組織サンプル、血液及び他の体液を含んで成る。

本発明はまた、上記ヌクレオチド配列を含んで成る診断用キットを含んで成る。

ちM. ツベルキュロシスの5 kbのDNAフラグメントからの挿入配列(1S986)を示し；

第5図は、企画された読み取り枠の位置を示し；

第6図は、他のIS3株要素の推定上のトランスポザーゼとIS986ORFbの可能性ある翻訳された生成物との整合を示し；

第7図は、他のIS3株要素の対応する領域とORFa1及びORFa2の可能性ある翻訳された生成物との整合を示し；

第8図は、ISTB及びIS3411の逆方向反復端の比較を示し；

第9図は、5C及びIS3411の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物の整合を示し；

第10図は、5C及びIS3の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物の整合を示し；

第11図は、5C、IS3411及びIS3の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物の整合を示し；

第12図は、M. ツベルキュロシスの5 kbのDNAフラグメントからの挿入配列(1S986)の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物とIS3411及びIS3のそれらとの整合を示し；

第13図は、M. ツベルキュロシスの5 kbのDNAフラグメントからの挿入配列(1S986)の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物とIS3411及びIS3のそれらとの整合を示し、ここでIS3411配列(1S341

1') のC-末端領域は1S3411配列の残りに関して、
-1フレームから読み取られ;

第14図は、プローブ9の制限地図を示し;そして

第15図は、プローブ5と12J-Bとの間の関係を図的に示す。

発明を実施するための態様

プローブ9及び5

M. ツベルキュロシスの臨床的単離物におけるプラスミドの可能性ある存在の研究の一部として、3種のそのような単離物からの完全なDNAを、サザンブロットにゆだね、そしてM. フォルツイタムからの天然に存在するプラスミドによりプローブした。pUS300として言及されるこのプラスミドは、Collection de l'Institut Pasteur, Tuberculose, Paris, France におけるM. フォルツイタム株C1PT14-041-0003 (1990年2月21日、NCTC12381として、National Collection of Type Cultures, Colindale, London UK NW9 5HTに寄託される) から得られた。その結果は、このM. フォルツイタムプラスミドにハイブリダイズすることができるM. ツベルキュロシスの株において染色体DNAフラグメントが存在し、そしてまた、BamHI又はPvuIIにより消化された材料において、ハイブリダイズするフラグメントの大きさは個々の株のために同じでないことを示した。

これらのハイブリダイズするフラグメントを単離するため

ープ5 (5 kbのフラグメント) として言及する。M. フォルツイタムのプラスミドpUS300とのハイブリダイゼーションによるプローブ5の単離は、Zainuddin and Dale, J. Gen. Micro. (1989) 135, 2347~2355ページにより詳しく説明される。

λクローンA3 (Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1989) Journal of General Microbiology 135, 2347~2355ページ) からの5 kbのEcoRIフラグメントを、プラスミドベクターpAT153を用いてクローンし、プラスミドpRP5000を生成した。pRP5000からの挿入体フラグメントのPvuIIによる消化は、プラント末端化されたフラグメントに転換され、そしてPvuIIにより消化されたpAT153と共に連結され、そしてそれぞれpRP5100, pRP5200及びpRP5300を生成する3種のフラグメント5A, 5B及び5C (第1図) を生成した。

BamHI, XhoI, HindIII及びSalIを用いて生成されたpRP5000, pRP5200及びpRP5300からの特定のサブフラグメント (第1図) を、M13クローニングキット (New England Biolabs) を用いてM13mp18及びM13mp19にクローン化した。pRP5000からのより小さなEcoRI-BamHIフラグメントをBluescript pKS中にクローン化し、そしてネステッド (nested) 欠失をErase-a-Base技法 (Promega) を用いて行なった。配列決定を、Taq及びT7ポリマラーゼ (Promega) 及びSequenase Version 2 (US Biochem

に、M. ツベルキュロシス (Public Health Laboratory, Du Inich, London, Englandから得られた50410株) の臨床的単離物からの完全なDNAライブラリーを、BamHI-消化されたEMBL4によるM. ツベルキュロシスのSau3AI部分消化物の連結によりメファージベクターEMBL4において構成した。そのライブラリーは、組換えプラスミドpUS301をラベリングすることによって誘導されるDNAプローブによりスクリーンされた。このプラスミドは、E. コリプラスミドベクターpUC19のEcoRI消化物によるプラスミドpUS300のEcoRI消化物の連結により構成された。陽性ブランクを、ブランクスクリーニングの追加の循環を通して精製した。下記のプローブは、この方法により得られた陽性ブランクの1つのEMBL4/A-3クローン (1990年2月21日、NCTC第12380としてNational Collection of Type Culture, Colindale, London UK NW9 5HTに寄託された) として言及される組換えファージから得られた。

この組換え体ファージEMBL4/A-3クローンからのDNAを抽出し、そしてEcoRIにより消化した。アガロースゲル電気泳動及びサザンブロットは、EcoRI消化EMBL4/A3が、約900個の塩基対 (9 kb) の1つ及び約5000個の塩基対 (5 kb) (プラスミドpUS300とハイブリダイズする) を含む一連のフラグメントを含むことを示した。これらのフラグメントをそれぞれゲルから切断し、そしてそれぞれプローブ9 (9 kbのフラグメント) 及びプロ

icals) により、370 Automated Sequencer (Applied Biosystems) を用いて行なった。少なくとも50 bpのオーバーラップを有するフラグメントを両方向に配列決定した。

GenBank, EMBL, MBRF及びSwissProtデータバンクの調査を、UWGCGパッケージ及びWordSearchプログラム (Devereux, J., Haeblerli, P. & Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Research 12, 387~395; 及びWilbur, W. J. & Lipman, D. J. (1983) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80, 726~730) 及びProtein Identification ResourceからのNAQプログラムにより、DaresburyでのSERC施設でSEQUENTコードを用いて行なった。配列分析を、M. ツベルキュロシスにおける好ましいコドン使用法の表 (Dale, J. W. and Patki, A. (1990), The Molecular Biology of Mycobacteria (McFadden, J. J. Ed.)) に基づいてのコドン選択分析 (Staden, R. & McLachlan, A. D. (1982) Nucleic Acids Research 10, 141~156) の使用により補足されて、配列比較のためにはDIAGON (Staden, R. (1982) Nucleic Acids Research 10, 2951~2961) 及び読み取り枠の同定のためにはPositional Base Preference (Staden, R. (1984) Nucleic Acids Research 12, 551~567) 及びShepherd R NY (Shepherd, J. C. W. (1981) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 78, 1596~1600) の両方法を用いて、Staden-Plus パッケージ (Amersham) により行なった。複数の配列の整合を、マニュアル調整により補足され

るCLUSTALソフトウェア(Higgins, D. G. & Sharp, P. M.(1988) Gene 73, 237~244)により行なった。

プローブ9

プローブ9を、Multiprime Random Primer Extension法(Amersham)を用いて³²Pによりラベルし、そしてM. ツベルキウロシス(単離番号50410, 60925, 61066, 61104, 61125, 61267, 61377, 61513)並びにM. ボビス(野生株、Central Veterinary Laboratory)及びBCG(NCTC5692)の8個の臨床的単離物からのPvuII消化された完全なDNAのサザンブロットにハイブリダイズした。アガロースゲル電気泳動の後、DNAフラグメントを、Hybond-Nフィルターに移し、そして80℃で1時間のベークイングにより固定した。そのフィルターを、ハイブリダイゼーション緩衝液中において68℃でプレハイブリダイズした。プローブによるハイブリダイゼーションを、68℃で一晩、同じ緩衝液中で行なった。

ハイブリダイゼーション緩衝液は、5×Denhardt溶液、5×SSPE緩衝液、0.2%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び100μg/mlの音波処理されたサケ精子DNAから成った。Denhardt溶液及びSSPE緩衝液を、次のようにして原溶液として製造した：

50× Denhardt溶液： 0.5gのFicoll(mw400,000)、0.5gのポリビニルピロリドン(mw40,000)、0.5gのウシ血清アルブミンを、滅菌された脱イオン蒸留水に溶解し、50mlの最終体積にし、

オエンセ、M. フラベスセンス、M. ゴルドナエ及びM. ケロネイ(2種の株)。

従って、プローブ9は、株間を区別する能力を伴って、M. ツベルキウロシス複合体(M. ボビス及びBCGを含む)に対して特異的である。

プローブ9の制限地図は第14図に示される。そのプローブは2種のEcoRI部位により結合され、そして4種のPvuII部位により、約3.5kb, 1kb, 4kb及び0.5kbのフラグメントに分割される。

プローブ5

プローブ5に対する研究は、それが、M. ツベルキウロシス複合体のM. ツベルキウロシス、M. ボビス、M. アフリカナム、M. ミクロチ及びM. ボビスBCGにおける種々の数のコピー(約15個まで)に存在すると思われる挿入要素(15986)をコードする配列を含んで成ることを示した。その挿入要素を、E. コリに見出される前記の挿入要素IS3及びIS3411と比較した。プローブ5の挿入要素は、たぶんトランスポザセをコードするIS3411にほぼ相同である。

プローブ5の制限地図は第1図に示される。そのプローブは、2つのPvuII部位で示されるようなフラグメント5A, 5B及び5Cに分割され得る。

5Cの配列は第2図に示される。有用な制限部位はボックスでかこまれ、そしてIS3411からの左側の逆方向反復体(1R)を有する29/40及びIS3からの逆方向反復

これをアリコートに分配し、そして-20℃で貯蔵した。

20× SSPE緩衝液： 3.6MのNaCl、20mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.2MのNaH₂PO₄/Na₂HPO₄(pH7.7)を、脱イオンされた蒸留水に溶解し、そしてオートクレーブ処理した。

次に、フィルターを2×SSCにより2度洗浄した(0.1%のSDSを含む2×SSC及び0.1%のSDSを含む0.1×SSCにより)。すべての洗浄は68℃で行なわれた。SSCを、次のようにして原液として製造した：

20× SSC： 3MのNaCl、0.3Mのクエン酸ナトリウムを、蒸留水に溶解し、そしてpHを7.0に調整した後、オートクレーブ処理した。

フィルターを、サラップにより被覆し、そして室温で16時間X-線フィルム(RX, Fuji)に露出した。

プローブ9にハイブリダイズされたM. ツベルキウロシスの個々の株は、いくつかのハイブリダイジングバンドを示した：このパターンの中のいくつかの要素は、株から株に異なり、そして他のものは一定に存続した。M. ボビス及びBCGはまた、M. ツベルキウロシスパターンのこの保存特徴を保持するパターンでプローブ9にハイブリダイズした。

結核菌の次の種(示される場合、それぞれ1つの株)は、いづれの有意な程度にもプローブ9とハイブリダイズしなかった：M. バラツベルキウロシス、M. イントラセルラレ、M. スクロフラセウム、M. フレイ、M. フォルツイタム(3種の株)、M. カンサイイ、M. アビウム、M. マルニ

体を有する20/40の配列は下線が引かれている(Ishiguro & Sato 1988, J. Bacteriology 170, 1902~1906; Timmerman & Yu 1985, Nucl. Acids Res. 13, 2127~2139)。IS3及びIS3411と比較される5Cの一部の一次DNA構造体を比較する線図が第3図に示される。

第4図は、プローブ5のフラグメント5B及び5Cの一部をオーバーラップするDNA配列を示す。第2図におけるように、有用な制限部位はボックスでかこまれる。PvuII制限部位は、フラグメント5Bと5Cとの間の連結部を定義する。このDNA配列は、第4図において下線を引かれた2つの逆方向反復体配列(27/30塩基マッチング)を含んで成る。左側の逆方向反復体CCTGAACCGCCCGGCATGTCGGAGAGCTCは、第1AccIII部位の5'側に向かってフラグメント5B内に位置し、そして右側の逆復単位GAGTCTCCGGACTACCGGGCGGTTACAGGは、第2AccIII部位の3'側に向かってフラグメント5C内に位置する。これらの逆方向反復単位配列の間の配列は、M. ツベルキウロシス複合体のメンバーにおける種々の数のコピーに存在する挿入要素15986(約1358bp)を含んで成る。

前記挿入要素の試験は、位置478で可能性ある翻訳開始コドン(GUG)を有する1つの長い読み取り枠(ORFb：塩基274~1311)及び逆方向にもう1つ(1107~622)を示した(第5図)。位置する好ましい塩基分析は、2つの短いORFs(6~275及び164~376)の部分と共に、可能性ある翻訳された領域としてこれらの両者を

示した。(下記に論ぜられるためには、後者の2つは一緒に考慮され、そしてそれぞれORF a 1及びORF a 2と命名され; たぶん翻訳されるべき領域は第5図に示されている。) ORF b及びそれよりも少ない程度のORF cのコバン使用法は、結核菌遺伝子により通常示される高い程度のコドンバイアスと合致する(Dale, J.W. and Patki, A. (1990), The Molecular Biology of Mycobacteria (F.C. Fadden, J.J., 版) 出版)。これはまた、ORF a 1及びORF a 2 (第2図)の指摘された領域のためにも真実であるが、但し、これらのORFs (下記に示される)の残りのためにはそうでなかった。

ORF bの仮説に基づく翻訳生成物の配列を、NBRF及びSwiss Protデータバンクに対してスクリーンした。1つの配列は、バックグラウンドよりも有意に高い相溶性により同定され、これはE. コリからの挿入配列IS 3 4 1 1の推定上のトランスボザーゼタンパク質であり(Ishiguro and Sato; 1988, J. Bacteriology 170, 1902~1906); 低い程度の類似性は、シゲラ ソンネイ (Shigella sonnei)からの2つの他の挿入配列、IS 6 0 0及びIS 6 2 6の配列から翻訳された仮説に基づくタンパク質により見出された(Matsutani, S., Ohtsubo, H., Maeda Y. & Ohtsubo, E. (1987) Journal of Molecular Biology 196, 445~455)。これらのすべての配列はIS 3の種類に属する。

これらの配列及びIS 3トランスボザーゼの複数の整合(Timmerman, K.P. & Tu, C-P.D. (1985) Nucleic Acids Research 13, 2127~2139)は、著しい程度の類似性(但し、I

IS 3 4 1 1タンパク質のC-末端部分を除く)を示す。IS 3 4 1 1のこの領域の異なった構造はまた、Ishiguro & sato (1988)により示されるようなIS 3及びIS 3 4 1 1の推定上のトランスボザーゼ(逆方向反復体により結合される挿入要素を含んで成るDNAセグメントのゲノムの他の部分での切断及び挿入を可能にするタンパク質)の整合から明らかである。しかしながら、IS 3、IS 3 4 1 1及びIS 9 8 6の完全な配列のすべての3種の読み取り枠の生成物の比較は、IS 3 4 1 1の-1読み取り枠とIS 9 8 6 ORF bのC-末端部分との相同性を示した。仮説に基づくフレームシフト(第6図)を有するIS 3 4 1 1生成物を用いての複数の整合(配列はIS 3 4 1 1における推定上のフレームシフトに対応する点で分裂し; その2つの部分は別々に整合し、そして手動的に再び組合された。IS 3 4 1 1の配列は、その配列の第1部分に対して-1読み取り枠から読み取られる)は、IS 9 8 6 ORF b生成物の27%のアミノ酸残基がまた、比較のために使用される他の3種の配列の中の少なくとも2種の配列に存在し、そしてこれらの約半分がすべての4種の配列において同一であることを示す。同一の残基群が、保存された特徴、L/VWV/AADLT YV, IHHT/SDRG SQ Y及びC/SYDNAを含む3種の領域に見出され得る。これらの領域の保存の程度は、それらがこのタンパク質の機能のために必須であることを示す。

ORF b (GUG_{...})における可能性ある出発コドンの前の配列は、たぶん有意ではないコンセンサスShine-Dalgarno

配列に対して弱い類似性のみを示す。従って、ORF bの可能性ある翻訳開始の性質が、その上流領域の試験により調べられた。IS 3、IS 3 4 1 1及びIS 9 8 6の翻訳生成物の3種の読み取り枠の比較は、さらに、この領域において類似性を示した。IS 3及びIS 3 4 1 1の両者において、その推定上のトランスボザーゼ遺伝子(ORF b)の先に、良好な翻訳開始シグナルを有する、約300塩基対の読み取り枠が存在する(Ishiguro, N. & Sato, G. (1988) Journal of Bacteriology 170, 1902~1906; 及びMatsutani, S., Ohtsubo, H., Maeda, Y. & Ohtsubo, E. (1987) Journal of Molecular Biology 196, 445~455)。これらのORFsの適切な領域の仮説に基づく生成物は、IS 9 8 6配列における可能性あるフレームシフトを示すORF a 1及びORF a (第7図)(示唆されたフレームシフトの位置まで及びそれから出発するORF a 1及びORF a 2の翻訳された生成物は、他の要素の対応する読み取り枠の生成物と連合された。ORF a 2を除くすべての配列は、推定されるAUG開始コドンから出発した)の生成物と十分に整合する。他方、第7図に示される配列中に5個のアミノ酸の可能性ある出発コドン(GUG_{...})が存在し; その結果、たぶんORF a 2は独立して翻訳される。第7図に示される可能性あるリボソーム結合部位は、単一の塩基によりGUGコドンから単に分離され、そして従って、確かでない有意性のものである。組合されたORF a 1及びORF a 2生成物のうち、29%の残基が、示される他の3種の配列のうち2種の配列に見出される。対の

比較は、その整合を確認し; たとえば、50%残基がIS 3 4 1 1のORF a生成物とマッチする。第7図に示される整合は、IS 3種類のいくつかの要素のORF a生成物が単に限界に近い相同性を示すSchwartzなど(Schwartz, E., Krogner, M. & Rak, B. (1988) Nucleic Acids Research 13, 2127~2139)の発見とは著しく異なっている。

IS 9 8 6のORF a 1は、位置54で可能性ある開始コドン(AUG)を有し、その先に、Shine-Dalgarnoコンセンサス配列とマッチする7個の塩基のうち5個の塩基を示す配列のいくつかの可能な割り当てを伴ってプリンに富む領域が存在する。IS 3種類のいくつかの他のメンバーに関して、推定上のトランスボザーゼ(ORF b)の翻訳は、ORF aからの読み取りにより生じると思われる。IS 3 4 1 1及びIS 3の両者において、翻訳停止シグナルで終るORF aは、配列AUGAを伴って、ORF bのための推定上の出発コドンとオーバーラップする。従って、この点で終結するリボソームは、オーバーラップするAUGコドンで再開始することができる。しかしながら、IS 9 8 6においては、ORF a 2はORF bとオーバーラップするが、ORF bのオーバーラップ領域において可能性ある出発コドンは存在しない。

融合タンパク質を生成するリボソームフレームシフトは、たぶん配列UUUAAAAACで、2種のORFsがオーバーラップする領域におけるIS 1 (Sekine, Y. & Ohtsubo, E. (1989) Proceeding of the National Academy of Sciences USA 86, 4609~4613)に生じることが示された。IS 3 4 1 1、I

IS3及びIS600のすべては、2種のORFs間のオーバーラップ領域において5~7個のA残基の種類を含む。IS986におけるORFa2とORFbとの間のオーバーラップ領域は、そのような長い種類のアデニンを含まないが、しかし配列UUUUAAG(324~331)はそのようなフレームシフトの出来事のための候補体であり得る。-1の方向における翻訳フレームシフトはまた、共通する配列を有すると思われる他の原核生物の遺伝子にも生じる(Atkins, J. F. Gesteland, R. F., Reid, B. R. & Anderson, C. W. (1979) Cell 18, 1119~1131)。

逆方向鎖上でのORFcの有意性は不明確である。最初の可能性ある出発コドン(AUG₁₀₀₂)の先に、Shine-Dalgarno配列に類似するいずれのものも存在しない。ORFcの分析は翻訳された配列と調和するが、他方、それはORFbと整合して存在し、そしてそれらの2種の鎖に対する分析方法は無関係でない。Schwartzなど(Schwartz, E., Kruger, M. & Rak, B. (1988) Nucleic Acids Research 14, 6789~6802)は、E. コリ要素IS150において類似するORFを同定し、これはコード機能を有すると思われる。逆方向鎖上でのORFsの存在は、他のIS要素の共通する特徴であり、そしてIS要素が外部転写により不必要に活性化されないことを確保する両タンパク質のための必要条件による可能性ある染色体上の遺伝子の移動の調節に包含されると思われる(Galas, D. J. and Chandler, M. (1989) Mobile DNA (Berg, D. E. and Howe, M. M., 版), 109~162 ページ, American Socie-

ty for Microbiology, Washington)。追加の研究が、M. ツベルキュロシスにおいて作用する翻訳(及び転写)制御シグナルの実際の性質を定義するために必要とされる。

IS986の塩基組成は、64%のG+Cで、M. ツベルキュロシスの典型である。従って、タンパク質レベルでそのように判断される、IS3種類の他のメンバーとの相同性がDNAレベル(データは示されていない)でほとんど目立たないことは驚きにあたらない。しかしながら、IS3種類の他のメンバー、特にIR端がIS986の端と78%同一であるIS3411(第8図)と逆方向反復体端との著しい程の類似性が存在する。

第9図は、5Cからの大きな読み取り枠が、E. コリからの挿入要素IS3411の大きな読み取り枠に対して強い相同性を有することを示す。それはまた、E. コリからのIS3に対しても相同である(第10図)。すべての3種の配列の整合が第11図に示される。IS3411及びIS3の配列と共に、M. ツベルキュロシス(IS986)の5kbのDNAフラグメントからの挿入配列の大きな読み取り枠の可能性ある翻訳された生成物の整合が第12図に示される。第13図においては、類似する比較が行なわれるが、しかしIS3411配列のC-末端領域(IS3411')は、IS3411配列の残りに対して-1の読み取り枠から読み取られる。

プローブ5を、M. ツベルキュロシス並びにM. ボビス及びBCGの22個の単離体により、プローブ9について記載

されているような実質的なハイブリダイゼーション実験により試験した。その条件はプローブ9について上記に記載されるのと同じであるが、但し、オートラジオグラフ法は、室温で6.5時間であった。

個々のM. ツベルキュロシス株は、5~15の強くハイブリダイズするフラグメント並びに多くのより弱いバンドを示した。バンドの数及びシグナルの強さ、並びに株間の変異は、それらの鎖の染色体におけるランダムに挿入された反復DNA要素の存在を示した。

M. ボビス及びBCGは、それぞれ2及び3個の主要バンドの類似するパターンを示した。従って、これらの生物は、M. ツベルキュロシスから及びお互いから容易に区別され得ない。

次の種の結核菌(示される場合を除き、それぞれ1種の鎖)は、プローブ5とハイブリダイズしなかった：M. パラツベルキュロシス、M. イントラセルラレ、M. フクロフラセウム、M. スレイ、M. フォルツイタム(3種の株)、M. カンザシイ、M. アビウム、M. マルニオエンセ、M. フラベスセンス、M. ゴルドナエ及びM. ケロネイ(2種の株)。

従って、プローブ5は、M. ツベルキュロシス複合体に対して特異的であり、そしてさらにM. ツベルキュロシス、M. ボビス及びBCG間を区別し、そしてM. ツベルキュロシスの株間を区別することができた。

サザンブロット上でのフラグメント5Aは、お互い2.1及び0.65 kbpでの同一のバンドを付与する、M. ツベル

キュロシス H₃, R_v及びH₃, R_a及びM. ボビス BCGからのDNAと強く且つ特異的にハイブリダイズし、但し、それはM. ツベルキュロシスのいずれかの株によるこれらの大きさのバンドを必ずしも付与しない。

産業上の適用性

同定され、そしてプローブ5の一部又はすべてを含んで成る配列の一部又はすべてが、遺伝子プローブとして使用され得る。特に、挿入要素を構成するような、5C及び5Bにおいて同定される配列の一部又はすべてが遺伝子プローブとして使用され得る。そのようなプローブがM. ツベルキュロシス複合体の細菌検体からの切断されたゲノムDNAに基づくハイブリダイゼーション研究に使用される場合、特徴的なバンドパターンが生成され、そして従って、そのようなプローブは、診断及び疫病学的手段として有用である。異なった種のみでなく、また種内の異なった株が特異的なバンドパターンを生成する。これは、特に、M. ボビス及び他の種からのM. ボビス BCG並びに実際、M. ボビス BCGからM. ボビスを区別するために有用である。プローブ5Aは、M. ツベルキュロシス複合体のすべてのメンバーを検出するために、一般的なプローブとして使用され得る。

プローブ5又はそのフラグメントの診断手段としての有用さは、次の特徴により十分である。

a) 挿入要素は、単に、M. ツベルキュロシス複合体(M. ツベルキュロシス、M. ボビス、M. アフリカナム及びM.

ミクロチ)のメンバーにおいて見出され、そして非病原性環境結核菌又はM. ラブラエのいずれにも見出されなかった。

b) プローブとしてプローブ5 (又は5における挿入要素の一部)を用いてのサザンブロット分析を用いて、種々のパターンバンドが、試験された個々のM. ツベルキュロシス単離体により見出される。これは、結核症の伝達を試験するために疫病学的研究において有用な手段である。

c) M. ツベルキュロシスとM. ボビスとの間及びたぶんより重要にはM. ボビスとM. ボビスBCGとの間の差異を示すことが最初のプローブの1つである。

d) M. ボビス及びM. ツベルキュロシスからM. ボビスBCGを区別するためにプローブとしての挿入要素の使用は、ワクチン化又は免疫抑制の後、播種性のBCG感染を有する患者において有用である。

e) 挿入要素(2つの挿入配列を両端に有する)は、未知の遺伝子の特徴づけることにおいて有用な遺伝的手段である。

従って、本発明は、M. ツベルキュロシス複合体の細菌メンバーをお互いから及び複合体でない他の細菌から区別し、そして特徴づける多くの手段を提供する。

たとえば、細菌のサンプルからのDNAが、特定の制限酵素により消化され、そしてハイブリダイゼーション分析が、ここに開示されるDNAのフラグメントをプローブとして使用して行なわれ(標準技法に従って)、ここで前記フラグメントは、サンプルDNAを切断するために使用される制限部位を含まない。たとえば、挿入要素内に位置し、そしていづ

れのPvuII部位も含まないプローブ5/5C(第1図及び第2図の塩基420~810を参照のこと)のBamHI~XhoIフラグメント(又はその一部が、M. ボビスBCG DNAのPvuII消化物をプローブするために使用された。これが行なわれる場合、単一バンドに対する強いハイブリダイゼーションが観察され、これは、試験されるM. ボビスBCG株において、挿入要素が単一コピーで存在することを示す。

サンプルDNAを切断するために使用される制限部位を含むプローブを使用すれば、サンプルDNAが、たとえば挿入要素の複数コピーを含む場合にまた生じるであろうように、すなわちM. ツベルキュロシス複合体のほとんどのメンバーに良く存在するように、複数のバンドハイブリダイゼーションが生じるであろう。それにもかかわらず、そのバンドハイブリダイゼーションパターンは、同じ種の異なった株間及びM. ツベルキュロシス複合体の異なった種間を区別するために使用され得る。M. ツベルキュロシス複合体のすべてのメンバーを検出するための一般的なプローブは、挿入配列からのDNAを含む必要はないが、しかしフランキンゲンDNA、たとえば上記のようにPvuII-EcoRIフラグメント5AからのDNAを独占的に含む必要がある。腸内細菌からの特徴づけられたIS要素に密接に関連する挿入配列のM. ツベルキュロシスにおける存在は、いくつかの観点から相当に有意なものである。検出される複数の制限フラグメントの長さの多型現象(Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1989) Jou

rnal of General Microbiology 135, 2347~2355)は、IS986の複数のコピーがM. ツベルキュロシスの異なった単離体における異なった部位で挿入されることを示す。この点において、それは、種々の単離体に関して同一のサザンブロットパターンを付与する、結核菌からの他の最近記載された反復要素とは異なる(Clark-Curtiss, J. E. & Walsh, G. P. (1989) Journal of Bacteriology 171, 4844~4851; Clark-Curtiss, J. E. & Docherty, M. A. (1989) Journal of Infectious Diseases 159, 7~15; 及びGreen, E. P., Tizard, M. L. V., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J. & Hermon-Taylor, J. (1989) Nucleic Acids Research 17, 9063~9072)。これは、IS986が、結核菌種のトランスポゾン突然変異誘発のための重要な値のものである、結核菌における機能的な転位要素であり得ることを示唆する。IS986の転位能力は、IS1について確立されたように(Sekine, Y. & Ohtsubo, E. (1989) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86, 4609~4613)、ORFaとORFbとの間のオーバーラップにおけるリボソームフレームシフトにより調節され得る。

広範囲の種類の源からのM. ツベルキュロシスの臨床的に単離された株におけるIS986の存在(Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1989) Journal of General Microbiology 135, 2347~2355)及びE. コリ及びM. ソンネイからのIS要素との関係は、M. ツベルキュロシス株の間の遺伝子材料のトランスファーの可能性及びグラム陰性細菌の獲得を

示す。M. ツベルキュロシスの少なくともいくつかの臨床株はプラスミドを担持し、そしてこれらはそのような要素の播種に役割を演じることが示され(Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1990) Tubercle 71);結核菌において複製するいくつかのE. コリプラスミドの能力(Zainuddin, Z., Kunze, Z. & Dale, J. W. (1989) Molecular Microbiology, 29~34)は、挿入配列のE. コリからM. ツベルキュロシスへの広がりを可能にする。しかしながら、接合は;M. ツベルキュロシスにおいて決して決定的に示されておらず、そしてその生物は、通常、たとえば腸における他の生物との偶発的な遭遇とは別として単独の存在性を有する。従って、挿入配列を担持するプラスミドの伝達は、たぶんまれな出来事であろう。IS要素の高いG+C組成は、M. ツベルキュロシスによるその獲得が最近の出来事ではないことを示唆する。これらの問題は、実験株及び臨床的な単離体におけるこの挿入配列の挙動の研究により解決され得る。

IS986は、M. ツベルキュロシス複合体のすべての種に見出されるが、但し、そのコピー数は異なり、そして他の結核菌種には見出されない(Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1989) Journal of General Microbiology 135, 2347~2355)。従って、IS986に基づくプローブは、病原性結核菌に対して高い特異性を有するであろう。ポリマラーゼ鎖反応(PCR)の使用と結合される場合、これは臨床学的検体におけるM. ツベルキュロシスの検出及び特定化のためにひじょうに感受性のシステムを提供するであろう。このプローブによ

り試験された M. ツベルキュロシス 単離体の広範な多型現象 (Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1989) *Journal of General Microbiology* 135, 2347~2355) は、臨床学的単離体をフィンガープリントすることによって、ひじょうに正確な疫病学的研究の実施を可能にする。このシステムに関して、すべてではないが、しかしほとんどの密接に関係する単離体は、種々のパターンのハイブリダイズ制限フラグメントを生成し、そして従って、社会を通して M. ツベルキュロシス の種々の株の広がりを追跡することが可能であろう。

プローブ 12

“プローブ 12” は、厳格な条件下で、EcoRI により消化された H₃₇Rv のライブラリーを H₃₇Rv DNA によりスクリーニングし、そして強くハイブリダイズするクローンを単離することによって得られる、M. ツベルキュロシス NCTC 7416 H₃₇Rv から約 25.2 kb の EcoRI フラグメントである。その 25.2 kb の EcoRI フラグメントは、約 8.9 kb, 3.8 kb, 3.5 kb, 3.0 kb (フラグメント 12 J)、1.8 kb (フラグメント 12 B)、1.6 kb, 1.4 kb 及び 1.2 kb (フラグメント 12 A) のフラグメントに PvuII により消化される。1.2 kb の 12 A フラグメントは、プローブ 5 又は 9 に対して特異的であり、そしてそれに関連しない M. ツベルキュロシス 複合体である。第 15 図は、プローブ 5 に関する 12 J 及び 12 B フラグメントの配置を示す。挿入配列を両端に有する DNA は、挿入要素がゲノムにおける多くの位置で挿入する事実のために、

それがプローブ 5 におけるフランキング DNA に同一でない場合、波状の線より示される。プローブ 12 J のフランキング DNA は、結核菌の多くの異なる種とハイブリダイズする。フラグメント 12 J は、広範囲の結核菌を検出するために診断用プローブとしての価値を有する。

プローブ 8

これは、H₃₇Rv の EcoRV ライブラリーをスクリーニングするハイブリダイゼーションにより単離される約 16.1 kb の EcoRV フラグメントを記載する。

M. ツベルキュロシス から DNA によりサザンブロット上でのプローブとして使用される場合、それは多くのフラグメントに結合する。PvuII 消化に基づいて、それは約 5.6 kb, 4.8 kb, 2.1 kb, 2.0 kb, 0.9 kb 及び 0.7 kb の大きさのフラグメントを生成する。それは、プローブ 5 及び 12 に関連するとは思えない。

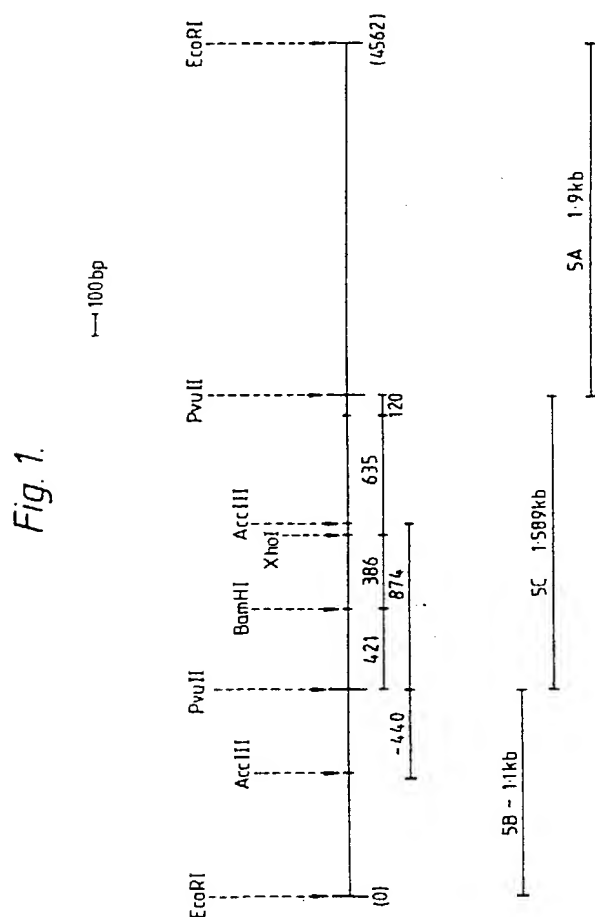


Fig. 2.

LeuThrGluLeuGlyValProIleAlaProSerThrTyrTyrAspHisIleAsnArgGlu
 CTGACCGAGCTGGCTGTGCGGATCGCCCTACGACCTACTACGACCATCAACCGGGAG
 PvuII 10 20 30 40 50 60

ProSerArgArgGluLeuArgAspGlyGluLeuLysGluHisIleSerArgValHisAla
 CCCAGCCGCGGAGCTGCGGATGGCGAAGTCTAAGGACCATCAGCCGCTCCACGCC
 70 80 90 100 110 120

AlaAsnTyrGlyValTyrGlyAlaArgLysValTrpLeuThrLeuAsnArgGluGlyIle
 GCCAACTACGGTGTTCGGTGGCGAAGTCTAAGCTGAACCGTGAGGGCATC
 130 140 150 160 170 180

GluValAlaArgCysThrValGluArgLeuMetThrLysLeuGlyLeuSerGlyThrThr
 GAGGTGGCCAGATGCACCGTCCGAACGGCTGATGACCAAACTCGGCTGTCCGGGACCC
 190 200 210 220 230 240

ArgGlyLysAlaArgArgThrThrIleAlaAspProAlaThrAlaArgProAlaAspLeu
 CGCGGCAAGCCGCGGAGGACCGATCGCTGATCCGGCCACAGCCGCTCCCGGCTATC
 250 260 270 280 290 300

ValGlnArgArgPheGlyProProAlaProAsnArgLeuTrpValAlaAspLeuThrTyr
 GTCCAGCGCGCTTCGGACCCAGCAGCCTAACCGGCTGTGGTAGCAGACCTCACCTAT
 310 320 330 340 350 360

ValSerThrTrpAlaGlyPheAlaTyrValAlaPheValThrAspAlaTyrAlaArgArg
 GTCTCGAGCTCGGCGAGGCTTCGCTACGCTGGCTTCTCAGCCGCTACGCTCGGAGC
 SalI 370 380 390 400 410 420

IleLeuGlyTrpArgValAlaSerThrMetAlaThrSerMetValLeuAspAlaIleGlu
 ATCCGTGGGCTGGCGGCTCGCTCCAGGATGGCCAGCTCCATGGTCTTCGACCGGATCGG
 BamHI 430 440 450 460 470 480

GlnAlaIleTrpThrArgGlnGlnGluGlyValLeuAspLeuLysAspValIleHisHis
 CAAGCCATCTGGACCCGCAACGAAGGCGTACTCCAGCTGAAGACCTTATCCACCATC
 490 500 510 520 530 540

ThrAspArgGlySerGlnTyrThrSerIleArgPheSerGluArgLeuAlaGluAlaGly
 ACCGATAGGGGATCTCAGTACATCGATCGGCTCAGGAGCGGCTCCGCGGAGGACGCG
 550 560 570 580 590 600

IleGlnProSerValGlyAlaValGlySerSerTyrAspAlaLeuAlaGluThrIle
 ATCCAGCCGCTGGTGGGAGCGGTCGCAAGCTCTTATGACATGCACTAGCCGAGACCATC
 610 620 630 640 650 660

AsnGlyLeuTyrLysThrGluLeuIleLysProGlyLysProTrpArgSerIleGluAsp
 AACGGCTATACAGCCGAGCTGATCAACCCGCAACCCCTGGCGGCTCCATCGAGGATC
 670 680 690 700 710 720

ValGluLeuAlaThrAlaArgTrpValAspTrpPheAsnHisArgArgLeuTyrGlnTyr
 GTGAGTGTGGCCACCGCGGCTGGGTCGACTGGTTCACCATCGCCGCTCTACCACTAC
 730 740 750 760 770 780

Fig. 2(cont)

CysGlyAspValProProValGluLeuGluAlaAlaTyrTyrAlaGlnArgGlnArgPro
 TCGGCGCAGCTCCCGCGGTCGAACTCGAGCTGCCTACTACGCTCAACGCCAGAGACCA
 790 800 810 820 830 840

AlaAlaGly***
 GCCGCGGCTGAGGCTCTCAGATCAGAGATCTCCGGAATCACCAGGCGGTTTCAGGCCCC
 850 860 870 880 890 900

GATGGTGTGCCCGGTGGTGATACGGGCACACAGCACCAGGTTGGCCAGCTCGGTGGCCC
 910 920 930 940 950 960

CACCGTCTGCCAATGTCCGATGTGGTGGCGGTGCAAAACCCGGGTGGCCCCACAACCGG
 970 980 990 1000 1010 1020

GAACCAACACAGTGGCGTCCGATGCTCAAGCGCAGAGCGCAACCGACGATTGATCTGAC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

GAGTCGTTCCGACCGCAGCCAATGACCTGCCCGTCAAGTTCAAAACAGGCGCTCAAGGTGG
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

CATCAGAGAGCAGATATCGGCGTTCGGACTCGCTGAGCAGCGGACCCAGGTGCAGGCCAG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

CGGACCGCTCTGCACTGTAGATGCATCACCACGGTGGTGTGCTGCCCATGTGGCCGAC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

GAGCCACCTCGGCGTCCGACCGCGCTCAACAGCAGCGAAACCGCTCAACATTGCCCG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

GCAACGGGGCGCGTGTATCCGACACACCGTCTGCTGTGTGCTGATCAGCGTTGTACTCGG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

CGATCAACCGCATCCAGATGAGACTGCAACCGCGCATCGAACTTCGCGCGCTCCACGTCCA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

AGCTTGATTCCGCCAACAACTGAAGTCTCATCGGCGCTCTCGGTGATCGAGGGCGCGGT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

TCCGCGCGAAATCCGGTTCCGGTTCGGGTTCGGGTTCGAACTTGAGCGCGGTCCGCGAG
 1510 1520 1530 1540 1550

Fig. 3.

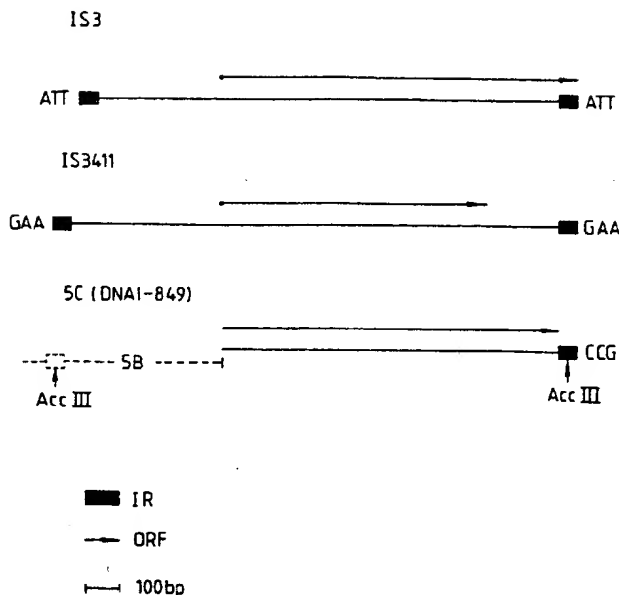


Fig. 4.

10 20 30 40 50
 CTTGAACCGC CCGCGCATGT CCGGAACTC CAGTCTCTGG AAAGGATGGG
 AccIII

60 70 80 90 100
 GTCATGTCAG GTGGTTCATC GAGGAGGTAC CCGCCGGAGC TCGGTGAGCG

110 120 130 140 150
 GCGCGTCCGG ATGGTCCGAG AGATCCGCGG TCAGCAGCAT TCGGAGTGGG

160 170 180 190 200
 CAGCGATCAG TGAGATCGCC CGTCTACTTG GTGTGCTGC GCGGAGACGG

210 220 230 240 250
 TCCGTAAAGTG GGTGCGCCAG GCGCAGGTGC ATGCCGCGCG ACCGCGCCGG

260 270 280 290 300
 ACCAGGACCG AAGAATCCGC TGAGATAAAG CGCTTCCGGC GGGACAAACG

310 320 330 340 350
 CGAATTGCCA AGGGGGAACG CGATTTTAA GACCGCGCTC GCTTTCTTCG

360 370 380 390 400
 CGGCGGAGCT CGACCGGCCA GCACGCTAAT TACCGCGTTC ATCGCGGATC

410 420 430 440 450
 ATCAGGGCCA CCGCGAGGGC CCGATGCTT TCGGGTGGGG TGTCGAGTTC

460 470 480 490 500
 ATCTCACA AGCTGACCA GCTGGGTGTG CCGATCGCCC CATCGACCTA
 5B PvuII-----> 5C

510 520 530 540 550
 CTACGACCAC ATCAACCGGG AGCCAGCGCG CCGGAGCTG CCGCATGGCG

560 570 580 590 600
 AACTCAAGGA GCACATCAGC CGCGTCCAGC CCGCAACTA CGGTGTTTAC

610 620 630 640 650
 GGTGCCCGCA AAGTGTGGCT AACCTGAAC CGTGAGGGCA TCGAGGTGGC

660 670 680 690 700
 CAGATGCACC GTCGAACGGC TGATGACCAA ACTCGGCTG TCCGGGACCA

710 720 730 740 750
 CCGCGGCAA AGCCCGCAGG ACCAGATCG CTGATCCGGC CACAGCCCGT

760 770 780 790 800
 CCGCGCGATC TCGTCCAGCG CCGCTTCGGA CCACAGCAC CTAACCGGCT

810 820 830 840 850
 GTGGGTAGCA GACCTCACT ATGTCTGAC CTGGGACGGG TTCGCTACG
 Sal I

Fig. 4 (cont)

860 870 880 890 900
 TGGCCTTTGT CACCGACGCC TACGCTCGCA GATCCCTGGG CTGGCGGGTC
 BamHI

910 920 930 940 950
 GCTTCCACGA TGGCCACCTC CATGGTCTC GAGCGGATCG AGCAAGCCAT

960 970 980 990 1000
 CTGGACCCGC CAACAAGAAG GCGTACTCGA CCTGAAAGAC GTTATCCACC

1010 1020 1030 1040 1050
 ATACGGATAG GGGATCTCAG TACACATCGA TCCGGTTCAG CGAGCGGGTC

1060 1070 1080 1090 1100
 GCGGAGGCAG GCATCCAACC GTCGGTGGGA GCGGTGGGAA GCTCCTATGA

1110 1120 1130 1140 1150
 CAATGCACTA GCGGAGACGA TCAACGGCTT ATACAAGACC GAGCTGATCA

1160 1170 1180 1190 1200
 AACCCGGCAA CCGCTGGCGG TCCATCGAGG ATGTGAGTT GGCCACCGCG

1210 1220 1230 1240 1250
 CGTGGCTCG AGTGGTTCAA CCATCGCGCG CTCTACCAGT ACTGCGGGGA
 Sal I

1260 1270 1280 1290 1300
 CGTCCCGCGG GTCGAACTCG AGCTGCTCA CTACGCTCAA CGCCAGAGAC
 Xho I

1310 1320 1330 1340 1350
 CAGCCGCGCG CTGAGGTCTC AGATCAGAGA GTCTCCGGAT TCACCGGGGC
 AccIII

GTTTCAGG

Fig. 5.

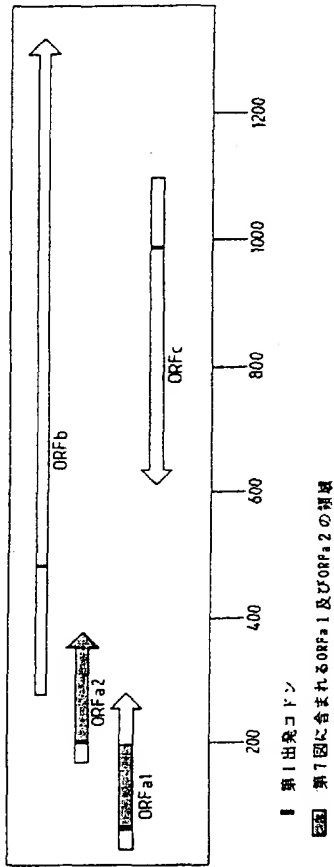


Fig. 7.

- * -> すべての相当する配列を通してマッチする
- * -> 保存性置換
- * -> IS986 (ORF1 または ORF2) は、2 種の他の配列とマッチする

```

ORF1  MSGGSS-----RRYPPELRERAVRMVAIRGQHSEWAAISEIARLLGV
ORF2  CAETVRKVR
IS3411  HTKWT-----RFSPEVRQRAVMVLESQSYDSQWATICSIAPKIGCTRETLRVVR
IS3  HTKVTSTSKPRKQHSPEFRSEALKL-----AERIGVTAAARELSLYESQVYNRS
IS600  MSKXT-----QRYSEKFAEAVRTVPENQ-----LSISEGASRLSPEGTIGQWVT
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORF2  QAQVDACARPOT-TTEESAIEIKLRDRAELRRANAILKTASAFFA-AELDRP-AR
IS3411  QHERDTGGGGLTAAERQRLKELERENRELRSDILRQASAYFAKAEFDRLWKX
IS3  KQHQQTSSEREL--EMSTEIARLKROLAERDEELAIQKAATYFAK--RL-K
IS600  AARKGLCTPGSRTVALESEYILQRLKALNARLERDILKATAYFA-QES--L-KNTR
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Fig. 8.

```

IS986. IRL  CCGTGAACCGCCCCCGGATGTC--GGAGACTC
IS986. IRR  CCGTGAACCGCCCCCGGATGTC--GGAGACTC
IS3411. IRL  TGAACCGCCCCCGG--GAATCCTGGAGACT
IS3411. IRR  TGAACCGCCCCCGG--GTTTCTGGAGACT
      : : : : : : : : : : : : : : : :

```

- * -> すべての 4 種の配列において同一である

Fig. 6.

- * -> すべての配列を通してマッチする
- * -> 保存性置換
- * -> IS986 (ORFb) は、2 種の他の配列とマッチする

```

ORFb  VPIAPSTYY---DHINREPSRRELDRGE---LKEHISRVRH
IS3411  MMPLLDKLRQYGVGGLCSLHIASTYYH-CQQRHNPDKRSARAQRDDWLKKQIQRVY
IS3  HKYV-FIEKHQAEFSIKAMCRVLRVARSQWYTCORRTRISTROQFR---QHCDSSVLAALF
IS600  HCQVFCVSRSGYNNWVQHEP---SDRKQSD---ERLKLEIKVAH
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORFb  AANYGVYGARKVWLTNRREGIEVARCTV-ERLMTKGLSGTTRGKARTTIADPATARPADL
IS3411  DENHKVYGVRRVWRLREGIEVARCTV-ARLMAVHGLAGVLRGKRVTTISRKAVA-AGHR
IS3  TRSKORYGAPRLTDELRAQGIFFMVKTVAASLRQ-GLRAKASRKFSFVSYRAHGLFVSENL
IS600  IRTRETYGTARLQTELAENGITVGRDL-ARLKLRLRCKQKRAFRTTSHNNLFPVAPNL
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORFb  VQRRFGPPAPNRLMVADLTYSVWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDAIEQA
IS3411  VNRQFVAERPDQLMVADLTYSVWAGFAYVAFIIVDFAGYIVGWRVSSMETTFVLDALIEQA
IS3  LEQDFYASGPHQWAGDITYLRTDEGWLILAVVIDLWSRAVIGWSMSPRTAQLACDALQMA
IS600  LNQTFAPTAPNQWVADLTYSVWAGFAYVAFIIVDFAGYIVGWRVSSMETTFVLDALIEQA
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORFb  IWTROQEGVLDLKDVIHNTORGSQYTSIRFSERLAEAGIOPSVGAVGSSYDNALAEITINGLY
IS3411  LWTTRPP
IS3411  -GTVHSDKGSQYVSLAYTORLKEAGLLASTGSTGDSYDNALAEITINGLY
IS3  LWRKRP-----RNVIVHTDRGGQYCSADYQALKRHLRSGMSAKGCCYDNACVESFFHSL
IS600  LRSQRP-----AGLTHSDRGSOYCAIDYVIEQSGKLTSMRSGNCYDNAPMESFWGTL
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
ORFb  KTELJKPKPWRISIEDVELATARWVD-WFNHRRLYQCGDVPVPELEAAYAQORQPAAG
IS3411  KAEVIHR-KSWKRAEVELATLWVD-WYNNRRLRLRGLHTTPPAEAF
IS3  KVECIH-GEHFSREIMRATVFMYTECDYNRHRHSGGGLSPEQ-----FENKYL--A
IS600  KNESLS-NYRFNHRDEAISVIREYIEFTNRQRHSLRGLNISPAA-----FREKYNQMAA
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Fig. 9.

- * -> すべての配列を通してマッチする
- * -> 保存性置換

```

IS3  LTEL-----GVPIAPSTYY---DHINREPSRRELDRGE---LKEHISRVRH
IS3411  MMPLLDKLRQYGVGGLCSLHIASTYYH-CQQRHNPDKRSARAQRDDWLKKQIQRVY
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
IS3  AANYGVYGARKVWLTNRREGIEVARCTV-ERLMTKGLSGTTRGKARTTIADPATARPADL
IS3411  DENHKVYGVRRVWRLREGIEVARCTV-ARLMAVHGLAGVLRGKRVTTISRKAVA-AGHR
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
IS3  VQRRFGPPAPNRLMVADLTYSVWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDAIEQA
IS3411  VNRQFVAERPDQLMVADLTYSVWAGFAYVAFIIVDFAGYIVGWRVSSMETTFVLDALIEQA
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
IS3  QAIWTROQEGVLDLKDVIHNTORGSQYTSIRFSERLAEAGIOPSVGAVGSSYDNALAEITINGLY
IS3411  QALWTRPP-----PARSITVIX-----VLSHYRWP-----TH
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
IS3  NGVLTTELITGKPMASIZ-DVELATARWVDWYNNRRLYQCGDVPVPELEAAYAQORQ
IS3411  SGLAKPDY-----HQQEVQATRTM-----RR-----ASHVITKRR-
      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
IS3  PAAG
IS3411  ----

```

Fig. 10.

```

* -> すべての配列を通してマッチする
* -> 保存性置換

IS  L-----TELGV-----PIAPSTYYDHNREPSRRELDRGELKEHISRVAANYG
IS3 MKYVFIKQAEFSIKAMCRVLRVARSQWYTCGR-RTRISTRO-QFROHCDSVLAFT
IS3 .....
IS  V-----YGARKVWLTINREGIEVARCTVERLMTKLGSGTTTGKARRITTIADPATARPADI
IS3 RSKQRYGAPRLTDELRAQGYPFNVKTVAAASLRQGLRAKASRXTSPVSYRAHGLPVSENL
IS3 .....
IS  VORRFGPPAPNRLVADLTIVSTWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDAIE
IS3 LEQDFYASGPNQWAGDITTLRTPEGWLYLAVVIDLMSRAVIGWSMSPRMTAQLACDALQ
IS3 .....
IS  QAIWTRQOEGVLDLKDVIHETDRGSQYTSIRFSERLAEAGIQPSVGAVGSSYDNALAEIT
IS3 MALWRRKRP-----ENVIVHTDRGGQYCSADYQAGLRHNLRGSMASAGCCYDNACVESF
IS3 .....
IS  NGLYKTELKPKGKFRSIEDVELATARWVD-WFNHRLYQYCGDVPFVLEAAYYQORQR
IS3 FMSLAVECIN-GEHFISRELNRATVFNIECDYNRRHRSWCGGLSPEQFENKLA-----
IS3 .....
IS  PAAG
IS3 -----

```

Fig. 12.

```

* -> すべての配列を通してマッチする
* -> 保存性置換

IS986 VPIAPSTYY---DHNREPSRRELDRGE---LKEHISRVA
IS3411 MM-PLLDKLEQYGVGFLCSLHIAPISTYYH-CQQRHHPDKRSARAQRDDWLKKQIQRYD
IS3 MKYVFIKQAEFSIKAMCRVLRVARSQWYTCGRTRISTROQFROHCD---SVVLAFT
IS3 .....
IS986 ANYGVYGARKVWLTINREGIEVARCTVERLMTKLGSGTTTGKARRITTIADPATARPADI
IS3411 DENHKVYGVKRVWQLLREGIRVARCTVARIMAVMGLAGVLRGKXVTTISRKAVA-AGHRV
IS3 RSKQRYGAPRLTDELRAQGYPFNVKTVAAASLRQGLRAKASRXTSPVSYRAHGLPVSENL
IS3 .....
IS986 RRFPGPPAPNRLVADLTIVSTWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDAIEQAIW
IS3411 RQFVAERPDQLWADITVSTWAGFVYAFIIVDFAGYIVGWRVSSSHETTFVLDALQALW
IS3 GDFYASGPNQWAGDITTLRTPEGWLYLAVVIDLMSRAVIGWSMSPRMTAQLACDALQMALW
IS3 .....
IS986 TROQEGVLDLKDVIHETDRGSQYTSIRFSERLAEAGIQPSVGAVGSSYDNALAEITNGLYK
IS3411 TRRPPA-----RSITVIZVLSHYRWP-----THSGLRKP-----DYNHQQEV
IS3 RRRKP-----RNVIVHTDRGGQYCSADYQAGLRHNLRGSMASAGCCYDNACVESFPHSLV
IS3 .....
IS986 ELIKPKGKFRSIEDVELATARWVD-WFNHRLYQYCGDVPFVLEAAYYQORQPAAG
IS3411 CATRMTTRRRASV-----FTRK-----
IS3 ECIN-GEHFISRELNRATVFNIECDYNRRHRSWCGGLSPEQFENKLA-----
IS3 .....

```

Fig. 11.

```

* -> すべての配列を通してマッチする
* -> 保存性置換

IS3 MKYVFIKQAEFSIKAMCRVLRVARSQWYTCGRTRISTROQFROHCDSVLAFTS
IS3411 MM-PLLDKLEQYGVGFLCSLHIAPISTYYH-CQQRHHPDKRSARAQRDDWLKKQIQRYD
IS3 LT-EL-----GVPIAPSTYY---DHNREPSRRE---LRDGLKKEHISRVA
IS3 .....
IS3 RQR-----YGAPRLTDELRAQGYPFNVKTVAAASLRQGLRAKASRXTSPVSYRAHGLPVSE
IS3411 YDENHKVYGVKRVWQLLREGIRVARCTVARIMAVMGLAGVLRGKXVTTISRKAVA-AG
IS3 EANYGVYGARKVWLTINREGIEVARCTVERLMTKLGSGTTTGKARRITTIADPATARPA
IS3 .....
IS3 HLEQDFYASGPNQWAGDITTLRTPEGWLYLAVVIDLMSRAVIGWSMSPRMTAQLACDA
IS3411 HRVNRQFVAERPDQLWADITVSTWAGFVYAFIIVDFAGYIVGWRVSSSHETTFVLDALQ
IS3 DLVQRRFGPPAPNRLVADLTIVSTWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDA
IS3 .....
IS3 LQMALWRRKRP-----RNVIVHTDRGGQYCSADYQAGLRHNLRGSMASAGCCYDNACVE
IS3411 LEQALWTRRP-----PARSITVIX-----VLSHYRWP-----
IS3 IEQAIWTRQOEGVLDLKDVIHETDRGSQYTSIRFSERLAEAGIQPSVGAVGSSYDNALAE
IS3 .....
IS3 SFFHSLKVEICN-GEHFISRELNRATVFNIECDYNRRHRSWCGGLSPEQFENKLA-
IS3411 THSGLRKPDI-----WQOEVQATRMTTRH-----RR-----ASHVFTK
IS3 IINGLYKTELKPKGKFRSIEDVELATARWVD-WFNHRLYQYCGDVPFVLEAAYYQ
IS3 .....
IS3 -----
IS3411 RR-----
IS3 RQRPAAG

```

Fig. 13.

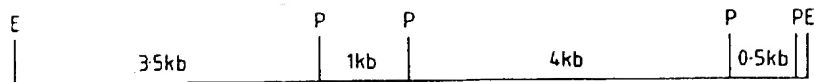
```

* -> すべての配列を通してマッチする
* -> 保存性置換

IS986 VPIAPSTYY---DHNREPSRRELDRGE---LKEHISRVA
IS3411 MM-PLLDKLEQYGVGFLCSLHIAPISTYYH-CQQRHHPDKRSARAQRDDWLKKQIQRYD
IS3 MKYVFIKQAEFSIKAMCRVLRVARSQWYTCGRTRISTROQFROHCD---SVVLAFT
IS3 .....
IS986 ANYGVYGARKVWLTINREGIEVARCTVERLMTKLGSGTTTGKARRITTIADPATARPADI
IS3411 DENHKVYGVKRVWQLLREGIRVARCTVARIMAVMGLAGVLRGKXVTTISRKAVA-AGHRV
IS3 RSKQRYGAPRLTDELRAQGYPFNVKTVAAASLRQGLRAKASRXTSPVSYRAHGLPVSENL
IS3 .....
IS986 VORRFGPPAPNRLVADLTIVSTWAGFAYVAFVTDAYARRILGWRVASTMATSMVLDAIEQ
IS3411 VNRQFVAERPDQLWADITVSTWAGFVYAFIIVDFAGYIVGWRVSSSHETTFVLDALQ
IS3 LEQDFYASGPNQWAGDITTLRTPEGWLYLAVVIDLMSRAVIGWSMSPRMTAQLACDALQ
IS3 .....
IS986 AIWTRQOEGVLDLKDVIHETDRGSQYTSIRFSERLAEAGIQPSVGAVGSSYDNALAEITN
IS3411 ALWTRRPPG TVHMDKGSQYVSLATTORLKEAGLLASTGCGSYDNALAEITN
IS3411 ALWRRKRP-----RNVIVHTDRGGQYCSADYQAGLRHNLRGSMASAGCCYDNACVESFPH
IS3 .....
IS986 LYLKTELKPKGKFRSIEDVELATARWVD-WFNHRLYQYCGDVPFVLEAAYYQORQPAAG
IS3411 LKXAEVIER-LSGKONKAVELATLTWVD-WFNHRLERLGRTPPAEAE-----
IS3 SLKVEICN-GEHFISRELNRATVFNIECDYNRRHRSWCGGLSPEQFENKLA-----
IS3 .....

```

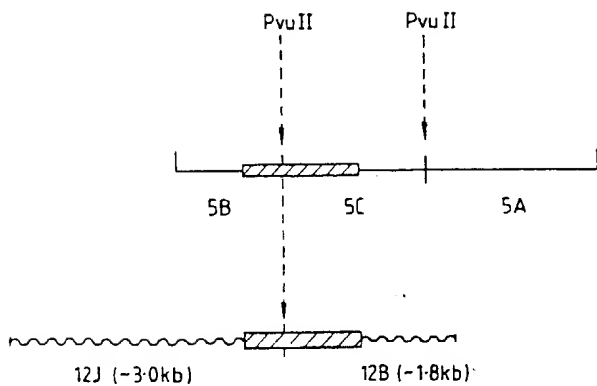
Fig. 14.



E = EcoRI

P = PvuII

Fig. 15.



国际调查报告

International Application No. PCT/GB 90/00276

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER in accordance with the International Classification of Patents (IPC) or in accordance with the International Classification of Patents (IPC) or in accordance with the International Classification of Patents (IPC)		
IPC ⁵ : C 12 Q 1/68, C 07 H 21/04, //C 07 K 13/00, 7/00		
2. FIELD SEARCHED		
Classification System: International Documentation System		
IPC ⁵ C 12 Q		
Documents searched other than those mentioned in the International Classification of Patents (IPC) or in accordance with the International Classification of Patents (IPC) or in accordance with the International Classification of Patents (IPC)		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage, of the relevant passage	Relevant to Claim No. 1
P	Journal of General Microbiology, volume 135, no. 9, September 1989, SGM, (GB), Z.F. Zainuddin et al.: "Polymorphic repetitive DNA sequences in Mycobacterium tuberculosis detected with a gene probe from a Mycobacterium fortuitum plasmid", pages 2347-2355 see the whole article, especially discussion (cited in the application)	1-17
X	--	6,7,15
A	Journal of Clinical Microbiology, volume 26, no. 11, November 1988, American Society for Microbiology, K.D. Eisenach et al.: "Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis", pages 2240-2245 see the whole article	1-17
<p>* Several categories of cited documents:</p> <p>"A" documents: documents of the general state of the art which are not considered to be of particular relevance</p> <p>"X" documents: documents not considered to be of particular relevance</p> <p>"Y" documents: documents which may have some relevance to the subject matter but which are cited to establish the background of the invention (cited for other technical reasons (as described))</p> <p>"O" documents: documents referred to in order to disclose, not, addition or other matter</p> <p>"P" documents: documents published prior to the international filing date but later than the priority date</p> <p>"T" documents: documents published after the international filing date of priority date and not in conflict with the application but used to determine the priority of the invention</p> <p>"E" documents: documents of particular relevance; the cited invention cannot be considered novel or cannot be considered to require an inventive step</p> <p>"F" documents: documents of particular relevance; the cited invention cannot be considered to require an inventive step when the document is compared with one or more other such documents, each document being given in a separate entry in the art.</p> <p>"G" documents: documents of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Issuance of the International Search Report	
29th May 1990	02 JUL 1990	
International Searching Authority	Signature of the International Searching Authority	
EUROPEAN PATENT OFFICE	[Signature]	

Form PCT/ISA/89 (Issued about January 1989)

11. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P,X	Nucleic Acids Research, volume 18, no. 1, January 1990, Oxford University Press, (GB) D. Thierry et al.: "IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex", page 188 see the whole article	1,2,5
A	Biological Abstracts, volume 87, 1989, (Philadelphia, PA, US), R.P. Prabhakara et al.: "Repetitive DNA sequence of Mycobacterium tuberculosis: Analysis of differential hybridization patterns with other mycobacteria", see abstract 103147, 4 J. LEPR. 56(4): 592-598	6,7,15

Form PCT/ISA 210 (extra sheet) (January 1993)

第1頁の続き

優先権主張

②1990年1月9日②イギリス(GB)②9000411.0

⑦発明者

キャットイー, デビッド

イギリス国, バーミンガム ビー15 2テージエイ (番地なし), ユニバーシティ オブ バーミンガム, メディカル スクール, スクール オブ メディカル サイエンス デパートメント オブ イミューナロジー アンド メディカル マイクロバイオロジ

⑦発明者

デール, ジェレミー ワトソン

イギリス国, サリー ジーユー1 3エルエー, ギルトフオード, エブソン ロード 49

⑦発明者

ツアイナツデイン, ザイナル
フアドツイラツデインビン

マレーシア国, 11800 ベナン (番地なし), ユニバーシティー
セインス マレーシア